

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 试剂盒(紫外吸收法)说明书

微量法 100 管/96 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

CAT(EC 1.11.1.6)广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中,是最主要的 H_2O_2 清除酶,在活性氧清除系统中具有重要作用。

测定原理:

H_2O_2 在 240nm 下有特征吸收峰, CAT 能够分解 H_2O_2 , 使反应溶液 240nm 下的吸光度随反应时间而下降, 根据吸光度的变化率可计算出 CAT 活性。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96 孔板 (UV 板)、研钵、冰和蒸馏水

试剂组成和配制:

提取液: 液体 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

工作液: 液体 24mL×1 瓶, 4℃ 保存;

粗酶液提取:

1、细菌、细胞或组织样品的制备:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

2、血清 (浆) 样品: 直接检测。

测定步骤:

- 1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 240nm, 蒸馏水调零。
- 2、测定前将 CAT 检测工作液在 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 10min 以上。
- 3、准备 96 孔 UV 板一块 (非普通酶标板, 普通酶标板只能透过可见光, 不能透过紫外光, 检测波长小于 340nm 务必使用 UV 板)。
- 4、在微量石英比色皿或 96 孔 UV 板中加入 10μL 样本和 190μL 工作液, 混匀, 记录 240nm 下初始吸光值 A1 和 1min 后的吸光值 A2。计算 $\Delta A = A1 - A2$ 。

注意事项: 出现负值怎么办?

首先检查吸光值是否超过 3, 如果超过 3 很可能是没有用 UV 板, 请换用 UV 板。如果未超过 3, 仍然出现负值则检查反应过程是否产生气泡, 气泡多说明酶活性太高, 气泡影响产生了负值, 可以将样本用提取液稀释 10 倍后再检测。如果稀释样本或反应体系没有产生气泡仍然出现较小的负值, 说明该样本测不到该酶活。

CAT 活性计算：**a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下**

1、血清（浆）CAT 活力的计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 459 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 CAT 活力计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 459 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 459 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.917 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：H₂O₂ 摩尔消光系数，4.36×10⁴ L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总数，500 万。

b.用 96 孔板测定的计算公式如下

1、血清（浆）CAT 活力的计算：

单位的定义：每毫升血清（浆）每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div V_{\text{样}} \div T = 918 \times \Delta A$$

2、组织、细菌或细胞中 CAT 活力计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T = 918 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 918 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化 1nmol H₂O₂ 降解定义为一个酶活力单位。

$$\text{CAT}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\varepsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.836 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积，2×10⁻⁴ L；ε：H₂O₂ 摩尔消光系数，4.36×10⁴ L / mol / cm；d：96 孔板光径，0.5cm；V 样：加入样本体积，0.01 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，1 min；W：样本质量，g；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；500：细胞或细菌总

数，500 万。

上海抚生实业有限公司
<http://www.affandi-e.com>

订购热线：400-990-7709

传真：021-57690166

上海抚生实业有限公司

联系电话：400-990-7709,021-52961052,021-52961053